

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS DE CURITIBANOS

CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS

CURSO DE AGRONOMIA

José Filipe dos Santos Maciel

**DESEMPENHO DA SOJA SUBMETIDA A DIFERENTES MÉTODOS  
DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO**

Curitibanos

2018

José Filipe dos Santos Maciel

**DESEMPENHO DA SOJA SUBMETIDA A DIFERENTES MÉTODOS DE  
INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, do Centro de Ciências Rurais do Campus de Curitiba da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> *PhD*. Sonia Purin da Cruz

Curitiba

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Maciel, José Filipe dos Santos

Desempenho da soja submetida a diferentes métodos de  
inoculação e coinoculação / José Filipe dos Santos Maciel ;  
orientadora, Sonia Purin da Cruz , 2018.

44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus  
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2018.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Agronomia. 3. Bacillus subtilis. 4. Pós  
emergência. 5. Sulco. I. , Sonia Purin da Cruz. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS DE CURITIBANOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia  
Rodovia Ulysses Gaboardi km3  
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitiba - SC  
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

JOSÉ FILIPE DOS SANTOS MACIEL

## DESEMPENHO DA SOJA SUBMETIDA A DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus de Curitiba da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Sonia Purin da Cruz

Data da defesa: 01/11/2018

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

---

Presidente e Orientador: Sonia Purin da Cruz *Sonia P. da Cruz*  
Titulação: Ph.D.  
Área de concentração: Microbiologia Ambiental e Aplicada  
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitiba, SC.

---

Membro Titular: Ana Carolina Lovatel *Ana Carolina Lovatel*  
Titulação: Mestre  
Área de concentração: Ciência do Solo  
Instituição: Universidade do Estado de Santa Catarina – Lages, SC

---

Membro Titular: Samuel Luiz Fioreze *Samuel*  
Titulação: Doutor  
Área de concentração: Agronomia/Agricultura  
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitiba, SC

Local: Universidade Federal de Santa Catarina  
Campus de Curitiba

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, força de vontade para seguir na caminhada sem medo e por todas as bênçãos possíveis que se encontram na fé.

A minha mãe Elenara pela vida, educação, pelo carinho, preocupação e dedicação em estar presente todos os momentos para que isto se tornasse realidade.

Ao meu pai Julio, por todo o esforço desempenhado no campo, pelos ensinamentos práticos, pelo incentivo, auxílio em todos os momentos e pela implantação deste trabalho no campo.

Ao meu irmão João (Jowbas) pela proximidade que temos e carinho um com o outro foi algo que me motivou a ser melhor sempre.

Aos meus avós Arlinda e Heitor Maciel por ceder a área para a realização deste trabalho (duas vezes), pelo contato da agricultura, pelos apelos, orações, incentivos e esforços para que tudo se tornasse concreto.

Aos meus avós *in memoriam* Vó Nita e Vô João pela educação, orações e apoio enquanto presentes.

A minha namorada e amiga Léa Oravec, pelo apoio, incentivo, ajuda e bons momentos compartilhados.

A minha orientadora professora Dra. Sonia Purin da Cruz pelas oportunidades de viajar, conhecer e desenvolver ainda mais o gosto pela área, pela mão de obra física e intelectual, pela confiança, apoio, ânimo e principalmente pela pessoa excepcional que é.

Ao grupo que com muita dedicação ajudaram para a execução e conclusão deste trabalho: Maurício, Joatan, Ezequiel, Ana Rosa, Camila, Gustavo, Julio, Renan, João Vitor e Vinícius.

A empresa Total Biotecnologia pelo amparo em todas as atividades e fornecimento de produtos para que este trabalho fosse possível, pelo auxílio financeiro por 3 anos, estágio final obrigatório, aprendizado e oportunidades.

A toda equipe da UFSC - Campus Curitibanos pela estrutura, ajuda e pela formação profissional. Todos os professores e servidores da UFSC que auxiliaram na minha caminhada até a formação acadêmica.

E a todos que de alguma forma estiveram presentes nesta etapa de minha vida.

Muito obrigado.

## RESUMO

A cadeia produtiva da soja é o que movimenta a maior parcela do agronegócio brasileiro e vem se consolidando a cada ano. O nitrogênio é o nutriente mais demandado pela soja, podendo ser disponibilizado pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Esse processo é realizado por bactérias diazotróficas e potencializado por Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs), comercializadas como inoculantes. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes métodos de inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis* na cultura da soja. O experimento foi realizado no município de Frei Rogério-SC, em condição de campo na safra 2017/18, em um delineamento de blocos ao acaso, com 8 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos foram: 1- testemunha; 2- testemunha nitrogenada; 3- inoculação com *B. japonicum* nas sementes; 4- inoculação com *B. japonicum* no sulco; 5- inoculação com *B. japonicum* em V3; 6- coinoculação com *B. japonicum* + *B. subtilis* nas sementes; 7- coinoculação com *B. japonicum* + *B. subtilis* no sulco e 8- coinoculação com *B. japonicum* + *B. subtilis* em V3. Foram avaliados os parâmetros nodulação, desenvolvimento vegetativo e nitrogênio da parte aérea aos 31 dias após a emergência, na época de colheita foram avaliados o rendimento e teor de nitrogênio dos grãos. As médias que foram identificadas diferenças estatísticas foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados. As variáveis massa da matéria seca da parte aérea, teor de nitrogênio da parte aérea e dos grãos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. A nodulação foi prejudicada pela adubação nitrogenada e os demais tratamentos não diferiram da testemunha. A produtividade obtida no T1, T2, T3, T5, T6 e T8 não diferiram entre si, estes tratamentos foram superiores aos valores encontrados no T4 e T7. A massa de mil grãos obtida no T2 foi superior aos demais tratamentos, entretanto esta superioridade não se resultou em produtividade. Dentro destas condições (solo com população elevada de rizóbios), tanto a inoculação com *B. japonicum* quanto a coinoculação de plantas de soja com *B. japonicum* + *B. subtilis* no sulco de semeadura foi ineficiente e mostrou redução na produtividade. Já a inoculação em pós-emergência se mostrou como uma boa alternativa para o produtor rural, entretanto são necessários mais estudos para a viabilidade desta técnica.

**Palavras-chave:** Pós-emergência, sulco, sementes, *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum*.

## ABSTRACT

The soybean complex is what drives most of the agribusiness economy in Brazil and is consolidating each year. Nitrogen is one of the most demanded nutrient for soybean and can be provided through Biological Fixation of Nitrogen (BNF). This process is done by diazotrophic bacteria and potentiated by other Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR's), commercially available as inoculants. This study aimed the evaluation the effects of different methods of inoculation and co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus subtilis* in soybean crops. The experiment was carried out in the region of Frei Rogério-SC, conducted in 2017/18 crop, a randomized block design with 8 treatments and 6 biological replicates. The applied treatments correspond to: 1- control; 2- control Mineral Nitrogen fertilization ; 3- inoculation with *B. japonicum* in seeds treatment; 4- inoculation with *B. japonicum* in-furrow; 5- inoculation with *B. japonicum* in spray at V3 development stage; 6- co-inoculation with *B. japonicum* + *B. subtilis* in seed treatment; 7- co-inoculation with *B. japonicum* + *B. subtilis* in in-furrow and 8- co-inoculation with *B. japonicum* + *B. subtilis* in spray at V3. The parameters nodulation, vegetative development and shoot nitrogen were evaluated at 31 days after the emergency, and the yield and nitrogen grain content were evaluated at the harvesting time. Statistical differences between treatments were identified. The averages that were identified statistical differences were compared by the Scott Knott test at 5% probability. However, the variables shoot dry matter mass and shoot nitrogen grain content, did not present statistical difference between the treatments. Nodulation was impaired by nitrogen fertilization and the other treatments did not differ from the control. There were not identified statistical differences between the productivity of T1, T2, T3, T5, T6 and T8. However, these treatments showed productivity values superior to the ones of T4 and T7. The thousand grain weight obtained in T2 was superior to the other treatments, however it did not resulted in productivity. Under the experimental conditions (soil with high rhizobia population), the soybean co-inoculation with *B. japonicum* + *B. subtilis* in-furrow was inefficient and resulted in productivity reduction. On the other hand, the post-emergence inoculation (spray) proved to be a good alternative for the farmers, although more studies are needed for the viability of this technique.

**Key words:** Post-emergence, in-furrow, seeds, *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pluviosidade (mm) e temperatura média do ar (°C), durante os períodos de condução do experimento. As setas indicam: 1- Implantação do experimento. 2- Coleta aos 31 dias após a emergência. 3- Colheita do experimento.....	19
Figura 2. Dimensões e área total de uma parcela experimental .....	20



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização física química do solo na profundidade de 0-20 cm antes da implantação do experimento em Frei Rogério – SC, 2017. ....	18
Tabela 2. Descrição dos tratamentos avaliados no experimento. ....	21
Tabela 3. Efeito de diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação da soja sobre variáveis de nodulação: número de nódulos, nódulos maiores que 2 mm, nódulos viáveis, massa da matéria seca dos nódulos, e massa da matéria seca da parte aérea, aos 31 dias após a emergência.....	26
Tabela 4. Efeito de diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação na soja sobre a porcentagem de nitrogênio da parte vegetativa e dos grãos aos 31 dias após a emergência e do rendimento da cultura.....	27

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1.	OBJETIVOS.....	12
1.1.1.	Objetivo Geral.....	12
1.1.2.	Objetivos Específicos.....	12
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
2.1.	A CULTURA DA SOJA .....	13
<b>2.2.</b>	<b>Dados nacionais sobre inoculantes e métodos de inoculação.....</b>	<b>13</b>
2.2.1.	Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas e a Coinoculação.....	16
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1.	LOCALIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL .....	18
3.2.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	19
3.3.	IMPLANTAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO .....	22
3.4.	AVALIAÇÕES .....	23
3.5.	ANÁLISE DOS DADOS.....	25
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
4.2.	MASSA DA MATÉRIA SECA DOS NÓDULOS.....	31
4.3.	MASSA DA MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA.....	32
4.4.	TEOR DE NITROGÊNIO DA PARTE AÉREA E NOS GRÃOS.....	34
4.5.	RENDIMENTO.....	35
4.5.1.	Produtividade.....	35
4.5.2.	Massa de mil grãos.....	37
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
	REFERÊNCIAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) possui grande importância na economia brasileira, pois representa a maior fatia do Produto Interno Bruto (PIB) agropecuário. No Brasil, a cultura passou a ter grande relevância no cenário agrícola a partir dos anos 70 e consolidou-se devido à importância nos aspectos nutricionais e proteicos (EMBRAPA SOJA, 2007).

A planta de soja é exigente em vários nutrientes para um bom desenvolvimento, e dentre eles o nitrogênio é o que apresenta a maior extração e exportação, sendo necessários em média 80 kg de N para produzir 1000 kg de grãos de soja (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). No entanto, todo este nitrogênio necessário à planta pode ser obtido exclusivamente pela inoculação, por meio da simbiose entre bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e o sistema radicular da soja. Após seu estabelecimento dentro dos nódulos nas raízes da soja, as bactérias são capazes de realizar o processo de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), e fornecer eficientemente este nutriente a cultura e proporcionar elevadas produtividades (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

O método de inoculação onde se utiliza somente uma espécie bacteriana é popularmente conhecida como inoculação padrão, pode ser realizada a base de inoculante turfoso ou líquido, sendo que este deve ser aplicado na semente e a semeadura ocorrer dentro de no máximo 24 horas (CAMPOS; HUNGRIA; TEDESCO; 2001). A coinoculação é uma técnica baseada na combinação de duas ou mais espécies de microrganismos, que provocam um efeito sinérgico, superando os resultados produtivos das plantas em comparação a aplicação isolada dos mesmos e/ou minimizar danos por estresses abióticos e oferecer maior resistência a fitopatógenos (FERLINI, 2006; BÁRBARO et al., 2009).

Para viabilizar e facilitar as técnicas de inoculação e coinoculação na cultura, em diferentes locais do mundo tem se estudado diferentes produtos, doses e métodos de aplicação, que basicamente são: inoculação nas sementes no momento da semeadura, inoculação via sulco de semeadura e inoculação pós emergência (RONSANI; PINHEIRO; PURIN, 2013).

A hipótese levantada no presente trabalho é que a utilização da coinoculação com as bactérias *B. japonicum* e *B. subtilis*, em qualquer forma de aplicação é eficaz para o aumento na nodulação e rendimento da cultura em comparação com a inoculação isolada de *B. japonicum*.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de diferentes métodos de inoculação e coinoculação de *B. japonicum* e *B. subtilis* para a cultura da soja como estratégia para aumentar nodulação, desenvolvimento vegetativo e o rendimento, como alternativa para o produtor rural.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- Verificar se há aumento de rendimento pela utilização da coinoculação das bactérias *B. japonicum* e *B. subtilis*;
- Verificar se há influência na nodulação, teor de nitrogênio da parte aérea e dos grãos, massa da matéria seca da parte aérea e rendimento;
- Verificar qual método de (inoculação/ coinoculação) terá maior influência sob a cultura.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. A CULTURA DA SOJA**

A soja é uma planta leguminosa exótica no Brasil e tem como centro de origem a região do nordeste da China, sendo cultivada há mais de 5000 anos. É uma dicotiledônea, com folhas trifolioladas (exceto o primeiro par), flores de fecundação autógama de coloração branca ou roxa e a maioria das cultivares modernas apresentam crescimento indeterminado. É uma das culturas mais importantes do agronegócio a nível de mundo e Brasil, sendo cultivada nos dois hemisférios e nas condições mais variadas de clima e solo (JULIATTI et al., 2004).

Do grão da soja se origina diversos produtos e subprodutos utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. A proteína é a principal substância de interesse, utilizada pela indústria de adesivos e nutrientes, alimentação animal, adubos, fabricação de fibra entre outros. Já o óleo extraído do grão é utilizado pela indústria de alimentos em geral e o óleo cru se transforma em óleo refinado e lecitina, que dá origem a vários outros produtos, que possuem valor mais barato em função da oferta (CÂMARA, 2000; EMBRAPA SOJA, 2007).

De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento CONAB, (2018), a área de cultivo de soja no Brasil na safra 2017/2018 foi de 35,1 milhões de hectares com produção de 118,9 milhões de toneladas e produtividade média de 3382 kg ha<sup>-1</sup>, representando um incremento de 3,5, 4,3 e 0,5% em relação à safra anterior, respectivamente. Esses valores correspondem a 35% da produção mundial de soja e 48% da produção total de grãos no Brasil. No cenário brasileiro, desde o ano de 2005, o estado do Mato Grosso apresenta maior área de cultivo (9,5 milhões de hectares) e produção de soja (32,3 milhões de toneladas), representando a nível nacional aproximadamente 27% de ambos parâmetros.

### **2.2. Dados nacionais sobre inoculantes e métodos de inoculação**

Com base nos dados da Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) a taxa média de adoção da inoculação no Brasil na safra 2017/2018 foi de 78%, levando-se em consideração um incremento de 8% com relação à safra anterior mesmo tratando-se de uma tecnologia consolidada e barata, ainda há aproximadamente 7,7 milhões de hectares sem a utilização desta tecnologia, um número que chama a atenção dentro do cenário agrícola brasileiro (ANPII; 2018).

Quanto a coinoculação, é sabido que houve uma redução na área cultivada com milho em 6% da safra 2016/ 2017 para a safra 2017/ 2018 (CONAB; 2018). Entretanto houve um aumento de 32% nas vendas de inoculante a base de *Azospirillum brasilense*, o que se remete a uma taxa maior de adoção da coinoculação na cultura da soja (ANPII, 2018).

A inoculação nas sementes, também denominada padrão por muitos autores, consiste basicamente na aplicação do rizóbio na semente, seja ele líquido ou turfoso, de acordo com a recomendação para cada região e suas condições. Na maioria dos trabalhos, apresenta resultados positivos em nodulação, nitrogênio da parte aérea e produtividade, por muitas vezes frustrando os pesquisadores, pois às vezes apresentam resultados iguais ou até superiores que outros fatores avaliados (MUNHOZ, 2016).

Braccini et al., (2016) estudaram a eficiência da coinoculação de *B. japonicum* e *Azospirillum brasilense* com diferentes modos de aplicação e seu efeito na nodulação, nos teores de N e nos componentes de produtividade da cultura da soja. Como resultados, encontraram que a aplicação isolada de *B. japonicum* líquido na semente teve incremento de produtividade (21%), massa da matéria seca da parte aérea (49%) e massa da matéria seca de nódulos (148%) em comparação com a aplicação isolada no sulco. Comparando a inoculação isolada de *B. japonicum* nas sementes e no sulco, Bárbaro-Torneli et al., (2018) não encontraram diferença estatística na produtividade, corroborando com esses resultados, Zilli et al., (2010) compararam as mesmas formas de inoculação não verificaram diferença estatística sobre as variáveis estudadas.

Desta forma, com o avanço da agricultura e suas tecnologias, as bactérias são inoculadas juntamente com diversos produtos fitossanitários e/ou micronutrientes, comprometendo sua viabilidade devido ao contato da bactéria com esses produtos. Para tentar diminuir os danos causados, outros métodos e produtos estão sendo desenvolvidos (HUNGRIA et al., 2015, CAMPO et al., 2010). A aplicação via sulco de semeadura é uma prática adotada, consolidada e recomendada tecnicamente, principalmente pela sua praticidade e eficiência, pois apresenta resultados parecidos e as vezes melhores do que com os obtidos na aplicação tradicional via semente. (EMBRAPA, 2008); (VIEIRA NETO, et al., 2008). Neste método, o rizóbio é aplicado na mesma operação de distribuição da semente com a utilização de equipamentos específicos como: tanque de água + inoculante, mangueiras e bicos para pulverização e tem surgido como uma estratégia capaz de tornar conciliável o processo de inoculação com o tratamento de sementes junto com produtos fitossanitários (HUNGRIA et al., 2007; VIEIRA NETO et al., 2008).

A diluição do inoculante na água, para aplicação no sulco de semeadura, melhora a distribuição do rizóbio na semente e no solo, distanciando-o da superfície e se estabelecendo onde há menor oscilação de temperatura e umidade, ficando melhor localizado para infectar as raízes da soja (VOSS, 2002). Correia (2015) estudando a comparação da inoculação no sulco e nas sementes, mostra que a inoculação via sulco de semeadura proporcionou um aumento de produtividade correspondente a 335 kg ha<sup>-1</sup>. O número de nódulos por planta também foi superior no tratamento de inoculação via sulco de semeadura, sendo igual a 37 nódulos por planta enquanto o tratamento com inoculação na semente apresentou 29 nódulos por planta. Zilli et al., (2010) encontraram um aumento de produtividade de 35% na inoculação via sulco de semeadura sobre a inoculação nas sementes no ano agrícola de 2007. Quanto a nodulação, na inoculação via sulco de semeadura a média foi de 20,6 nódulos por planta e na inoculação via sementes foi de 2,7 nódulos por planta.

Além da inoculação no sulco, a aplicação de inoculante em pós-emergência é um método que vem apresentando bons resultados e é realizada após as plantas emergirem entre os estádios V3 e V5, neste método o inoculante já misturado com água é pulverizado sobre a linha de semeadura, onde há plantas. Pode ser utilizada como um complemento para a forma de inoculação adotada, para tentar amenizar problemas de uma má inoculação na semeadura e/ ou promover um aumento de FBN em solos que não fornecem condições básicas para a sobrevivência das bactérias. Podendo adotar doses iguais as aplicadas no sulco de semeadura (ZILLI et al., 2008).

Boonkerd et al., (1985) avaliaram plantas de soja com 0, 5, 10, 15 e 20 dias após a emergência em três locais diferentes na Tailândia, em resposta a inoculação pós emergência. Os resultados encontrados com relação a nodulação foram em média 13% menores com a inoculação pós emergência aos 10 dias após a emergência quando comparada com a inoculação na semeadura.

Zilli et al., (2008) encontraram teores de nitrogênio acumulado iguais estatisticamente entre os tratamentos de inoculação padrão e inoculação pós emergência sendo 210,9 e 174,1 mg planta<sup>-1</sup> respectivamente. Os outros fatores avaliados, tais como: número de nódulos, massa da matéria seca dos nódulos e da parte aérea, e produtividade, foram inferiores no tratamento de inoculação pós emergência comparado com a inoculação padrão.

Por outro lado, Munhoz (2016) avaliando a inoculação pós-emergência encontrou aumento significativo de 60% na produtividade, em comparação com a inoculação padrão.

### 2.2.1. Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas e a Coinoculação

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP's) são classificadas como microrganismos benéficos que podem influenciar o crescimento das plantas através do aumento na disponibilidade de nutrientes minerais, produção de fitohormônios e da supressão de microrganismos deletérios da rizosfera (MELO; AZEVEDO, 1998). Dentre as espécies mais estudadas podem-se citar: *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Enterobacter* sp., *Azotobacter* sp. entre outras (MELO; AZEVEDO, 1998).

Através de vários mecanismos pode ser realizada a promoção de crescimento vegetal com rizobactérias do gênero *Bacillus*, como por exemplo a produção de fitohormônios estimuladores do crescimento (DATTA et al., 1982), a mobilização do fósforo (FREITAS et al., 1997; DATTA et al., 1982), a produção de sideróforos e antibióticos (LUZ, 1996), a inibição da síntese de etileno (GLICK et al., 1994), a indução de resistência das plantas contra fitopatógenos pela eliminação dos microrganismos deletérios e de seus metabólitos tóxicos presentes na zona radicular (LUZ, 1996; RAMAMOORTHY et al., 2001).

Como exemplos dos efeitos de RPCP's na produção de algumas culturas pode-se citar aumentos de 48% na produção de cenoura com a inoculação de *B. subtilis* (Merriman et al., 1974) e aumento de 37% na produção e nodulação de amendoim com *B. subtilis* (Turner e Backman, 1991). Segundo Lanna Filho (2010) e Tsavkelova et al., (2006), *B. subtilis* sob certas condições consegue realizar a regulação hormonal nas plantas, interferindo no crescimento das raízes devido a síntese de citocinina, giberelina e auxina. Costa et al., (2013) verificaram que algumas estirpes não nodulíferas produtoras de AIA dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Paenibacillus* aumentaram a produção de massa da matéria seca da parte aérea e da raiz de feijão-caupi. Por outro lado, Li et al., (2008), não encontraram nenhum efeito da inoculação em soja com estirpes produtoras de AIA dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*.

Araujo e Hungria (1999) avaliando a viabilidade da coinoculação com *B. japonicum* + *B. subtilis* em Londrina - PR e Ponta Grossa - PR, na safra de 1993/94 não perceberam diferença estatística com a aplicação desta coinoculação nas variáveis: rendimento, nodulação em V3 e R2 em ambas as áreas avaliadas. Da mesma forma Marinković et al., (2016) avaliaram na Sérvia, os mesmos tratamentos, e a coinoculação com *B. subtilis* resultou em uma queda de produtividade de 144 kg ha<sup>-1</sup> em comparação a inoculação tradicional com *B. japonicum*. Entretanto, Schäfer (2017) inoculou *B. subtilis* isolado na semente e obteve incremento de produtividade de 360 kg ha<sup>-1</sup> em relação à testemunha.



Assim, com o avanço dos estudos nestas RPCP's surgiu a coinoculação, que é uma técnica que se baseia na mistura de inoculantes oficialmente recomendados para a soja com outras RPCP's ou bactérias associativas. Apresentando-se como uma alternativa rentável para os agricultores. Esta técnica apresenta melhores resultados na FBN e maiores produtividades do que cada bactéria isolada, podendo ser utilizada na semente, no sulco de semeadura e em pós emergência das plantas. A coinoculação mais utilizada e recomendada na cultura da soja é com *B. japonicum* e *Azospirillum brasilense*, mas surgem diversos estudos neste ramo para tentar encontrar outros métodos, espécies e/ou estirpes que possam ter os mesmos efeitos ou melhores (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

Desta forma abre-se uma variedade muito grande do ponto de vista comercial e agrônômico, pois há uma combinação composta de: diferentes espécies de microrganismos, estirpes, coinoculação com dois, três ou mais microrganismos, diferentes formas de aplicação, doses e diferentes culturas a serem exploradas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LOCALIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido no período entre 16 de novembro de 2017 a 15 de março de 2018, na localidade do Salto Correntes, em Frei Rogério - SC entre as coordenadas 27°11'55"S e 50°43'40"O a 815 metros em relação ao nível do mar (Figura 3).

Figura 3. Imagem aérea identificando a área experimental no detalhe em vermelho.



Fonte: O autor (2018).

O solo da área é classificado como Cambissolo Háplico de textura argilosa (SANTOS et al., 2014), assim antes da implantação foi coletada uma amostra para análise laboratorial, de acordo com a metodologia descrita em Tedesco et al., (1995) e os resultados se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização física química do solo na profundidade de 0-20 cm antes da implantação do experimento em Frei Rogério – SC, 2017.

pH	SMP	Ca	Mg	Al	H+Al	K	CTC efe.	CTC pH 7	Argila	V	m	M.O	P
H <sub>2</sub> O			-----cmolc/ dm <sup>3</sup> -----							-----%-----			mg/dm <sup>3</sup>
5,7	6	6,16	4,37	0,3	4,4	0,2	8,91	13	46	66,2	3,37	4	6,8

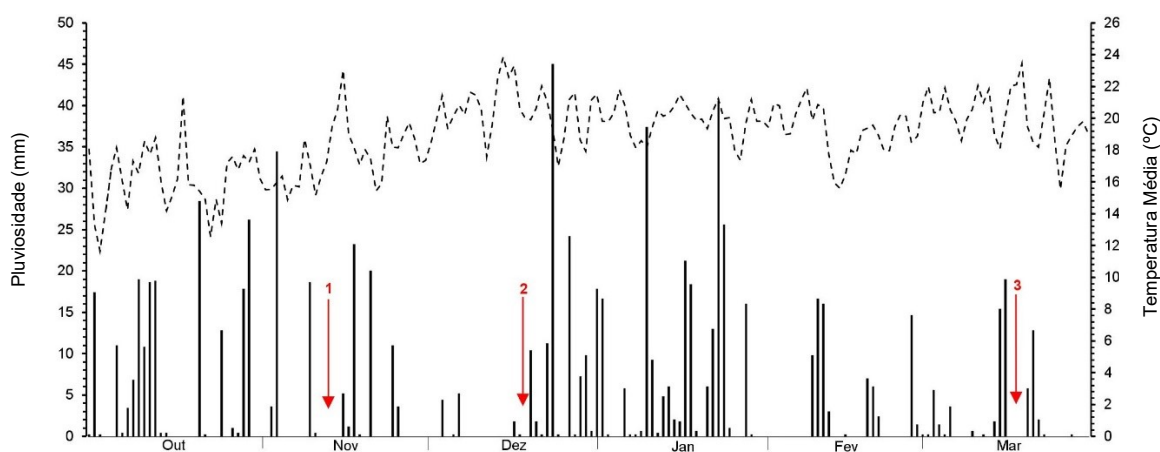
V= Saturação por Bases; m= Saturação por Alumínio; M.O= Matéria Orgânica.

A área do estudo que compreendia pastagem de aveia consorciada com azevém destinadas para bovinos de corte apresenta mais de 10 anos de produção sojícola com a

utilização de inoculantes e tem uma população de  $6,4 \times 10^6$  UFC gr<sup>-1</sup> de solo, conforme análise de população de rizóbios no solo pelo método do Número Mais Provável por Infecção em Planta.

O clima da região, segundo a classificação de Köppen, (1931), denomina-se Cfb, mesotérmico úmido com inverno chuvoso e verão ameno, temperatura média entre 15°C e 25°C, com uma precipitação média anual de 1500 mm. Os valores médios de temperatura e precipitação pluviométrica para o período de condução do experimento são apresentados na Figura 1. O acumulado de chuva no período de cultivo foi de 701,6 mm e a temperatura média foi 19,1 °C.

Figura 1. Pluviosidade (mm) e temperatura média do ar (°C), durante os períodos de condução do experimento. As setas indicam: 1- Implantação do experimento. 2- Coleta aos 31 dias após a emergência. 3- Colheita do experimento.



Fonte: Estação Meteorológica de Curitiba - A860 do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (2018).

### 3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em um delineamento em blocos ao acaso, com 8 tratamentos e seis repetições. Cada unidade experimental constituiu de uma parcela de 3,5 m por 6,5 m como pode ser observado na Figura 2. Os tratamentos estão descritos na Tabela 2.

Figura 2. Dimensões e área total de uma parcela experimental.



Fonte: O autor (2018).

Tabela 2. Descrição dos tratamentos avaliados no experimento.

Tratamentos e produtos utilizados		Dosagem	Modo de aplicação	Ocasião da aplicação
1	- Testemunha	-	-	-
2	- Testemunha nitrogenada (Super N <sup>®</sup> )	- 200 kg ha <sup>-1</sup> de N	- 100 kg a lanço na linha e 100 kg em cobertura	- Semeadura - 31 dias após a emergência
3	- <i>B. japonicum</i>	- 2 mL kg <sup>-1</sup> de semente	- Inoculação padrão na semente	- Semeadura
4	- <i>B. japonicum</i>	- 300 mL ha <sup>-1</sup> diluídos em 150 L ha <sup>-1</sup> de água	- Inoculação no sulco	- Semeadura
5	- <i>B. japonicum</i>	- 1000 mL ha <sup>-1</sup> diluídos em 150 L ha <sup>-1</sup> de água	- Inoculação pós emergência com jato dirigido na base da planta	- Entre os estádios V3-V5
6	- <i>B. japonicum</i>	- 2 mL kg <sup>-1</sup> de semente	- Coinoculação na semente	- Semeadura
	- <i>Bacillus subtilis</i>	- 1 mL kg <sup>-1</sup> de semente		
7	- <i>B. japonicum</i>	- 300 mL ha <sup>-1</sup> diluídos em 150 L ha <sup>-1</sup> de água	- Coinoculação no sulco	- Semeadura
	- <i>Bacillus subtilis</i>	- 100 mL ha <sup>-1</sup> diluídos em 150 L ha <sup>-1</sup> de água		
8	- <i>B. japonicum</i>	- 1000 mL ha <sup>-1</sup> diluídos em 150 L ha <sup>-1</sup> de água	- Coinoculação pós emergência com jato dirigido na base da planta	- Entre os estádios V3-V5
	- <i>Bacillus subtilis</i>	- 300 mL ha <sup>-1</sup> diluídos em 150 L ha <sup>-1</sup> de água		

Fonte: o autor (2018).



### 3.3. IMPLANTAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

A adubação de base constou da aplicação de uma mistura formulada de NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) (00-18-18), que foi aplicada na dosagem de 350 kg ha<sup>-1</sup> no momento da semeadura em todos os tratamentos. A adubação de cobertura e na base, para o tratamento pré-determinado (T2) foi com Super N<sup>®</sup> contendo 45% de nitrogênio e inibidor de urease.

Os inoculantes utilizados foram TotalNitro Full<sup>®</sup>, que é um inoculante líquido comercial para soja composto pelas estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e 5080 em uma concentração de 7 x 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, com registro no MAPA PR-9392310035-1 e Vult<sup>®</sup> que é um inoculante líquido comercial composto pela estirpe CCTB04, a base de endósporos de *B. subtilis*. Este é produzido na concentração de 1,0 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, com registro no MAPA PR-9392310112-8 (Figura 3). Os endósporos são estruturas dormentes, resistentes e não reprodutivas, produzidas por alguns gêneros de bactérias e basicamente garantem a sobrevivência do microrganismo por longos períodos sob condições ambientais desfavoráveis (TORTORA et al., 2010).

Figura 3. Inoculantes utilizados no experimento (à esquerda TotalNitro Full e à direita Vult).



Fonte: o autor (2018).

A semeadura foi realizada manualmente com espaçamento de 0,5 m entre linhas com 12 a 14 sementes por metro como pode ser visto na Figura 4. A cultivar utilizada foi a NA

5909 RG<sup>®</sup> da Nidera, com flores roxas e apresentando hábito de crescimento indeterminado, com grupo de maturação 6,2.

Figura 4. Implantação do experimento (semeadura manual).



Fonte: o autor (2018).

Todas as sementes utilizadas foram previamente tratadas com Standak Top<sup>®</sup> na dosagem de 2mL kg<sup>-1</sup> de sementes. Os inoculantes foram fornecidos pela empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda., com sede no município de Curitiba - PR. O controle de doenças, insetos-praga e plantas daninhas foi efetuado conforme o padrão do produtor.

### 3.4. AVALIAÇÕES

Todas as avaliações foram adaptações de metodologias recomendadas pelo protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, cepas e outras tecnologias relacionada ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas (ANAIS 13<sup>a</sup> RELARE, 2007).

Aos 31 dias após a emergência foi realizada uma coleta para avaliar a nodulação e massa da matéria seca da parte aérea das plantas. A coleta foi executada com auxílio de uma pá de corte, a mais ou menos 30 cm de profundidade, retirando-se sete plantas aleatoriamente de cada parcela, respeitando a área útil e duas linhas de bordadura de cada lado como mostra na Figura 5.

Figura 5. Coleta para avaliação da nodulação e massa da matéria seca da parte aérea das plantas aos 31 dias após a emergência



Fonte: o autor (2018).

As plantas foram acondicionadas em sacos e levadas ao laboratório de Microbiologia da UFSC Campus de Curitibanos. Inicialmente as plantas foram acomodadas em baldes cheios de água, com o intuito de desgrudar o solo e facilitar a retirada dos nódulos. Posteriormente as raízes foram lavadas com água corrente, em seguida separadas da parte aérea, sendo cortadas no ponto de inserção dos cotilédones.

Os nódulos foram retirados das raízes para determinação do número total por planta. Posteriormente, foram peneirados em uma peneira com malha de 2 mm. Os nódulos maiores que 2 mm ali retidos foram contados, determinando-se assim o número de nódulos maiores que 2 mm. Estes foram divididos ao meio para avaliação da viabilidade, detectada pela coloração róseo-avermelhada apresentada em seu interior, determinando-se assim o número de nódulos viáveis.

Todos os nódulos de cada planta foram colocados em sacos de papel e levados para a estufa de circulação forçada com temperatura média de 65°C, até atingirem massa constante. Após a secagem, a massa da matéria seca dos nódulos foi determinada em balança analítica.

A parte aérea das plantas foram acomodadas em sacos de papel pardo e levadas a estufa de circulação forçada com temperatura média de 65°C, para secagem do material, até terem atingido massa constante, cada amostra foi pesada em balança semi-analítica. Em



seguida, as amostras foram moídas e guardadas para posteriormente ser efetuada a análise de nitrogênio foliar.

No laboratório as mesmas foram submetidas a análise de nitrogênio foliar segundo Tedesco et al., (1995) consistindo em uma adaptação do método de Kjeldahl, que é uma digestão úmida das amostras para posterior destilação e titulação.

A análise de rendimento foi efetuada aos 111 dias após a emergência no estágio de maturação pleno das plantas, dividida em dois componentes: produtividade e massa de mil grãos secos. Todas as plantas em 8 metros lineares de cada parcela foram coletadas, respeitando-se duas linhas laterais e um metro de cabeceira como área de bordadura. As plantas coletadas foram submetidas à trilha em um batedor para separação da parte aérea dos grãos.

Os grãos recém colhidos de cada parcela foram pesados, e uma quantidade entre 100-200g foi acondicionada em sacos de papel pardo e secada para determinação da umidade. As amostras foram levadas ao laboratório e colocadas em estufa de circulação forçada com temperatura aproximada de 65°C, onde permaneceram até atingir massa constante. Os valores de produtividade expressos em kg ha<sup>-1</sup> foram corrigidos para o valor com 13% de umidade.

Os grãos foram moídos e posteriormente submetidos a análise de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, a mesma empregada para determinação de nitrogênio foliar.

### 3.5. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ( $p \leq 0,05$ ) e as médias dos tratamentos, quando detectadas variações significativas, foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), com auxílio do software Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 são apresentados os valores médios correspondentes às avaliações de nodulação e massa da matéria seca da parte aérea aos 31 dias após a emergência da cultura.

Tabela 3. Efeito de diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação da soja sobre variáveis de nodulação: número de nódulos, nódulos maiores que 2 mm, nódulos viáveis, massa da matéria seca dos nódulos, e massa da matéria seca da parte aérea, aos 31 dias após a emergência.

Tratamentos	Número de nódulos (nº planta <sup>-1</sup> )	Número de nódulos maiores que 2 mm (nº planta <sup>-1</sup> )	Número de nódulos viáveis (nº planta <sup>-1</sup> )	Massa da matéria seca dos nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Massa da matéria seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )
1) Testemunha	12,86 a*	8,19 a	8,19 a	21,9 a	0,99 <sup>ns</sup>
2) Testemunha Nitrogenada	2,09 b	0,1 b	0,08 b	0,73 b	1,45
3) <i>B. japonicum</i> (Sementes)	15,88 a	10,22 a	10,08 a	40,33 a	1,56
4) <i>B. japonicum</i> (Sulco)	14,97 a	9,27 a	9,13 a	39,01 a	1,08
5) <i>B. japonicum</i> (Pós emergência)	14,86 a	7,52 a	7,52 a	34,46 a	0,97
6) <i>B. japonicum</i> + <i>B. subtilis</i> (Sementes)	12,55 a	7,94 a	7,83 a	30,24 a	1,21
7) <i>B. japonicum</i> + <i>B. subtilis</i> (Sulco)	14,25 a	6,94 a	6,92 a	32,73 a	1,39
8) <i>B. japonicum</i> + <i>B. subtilis</i> (Pós emergência)	15,89 a	9,08 a	9,05 a	36,59 a	1,28
CV (%)	21,21	35,00	35,49	31,93	35,14

\* Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> Diferença não significativa pela ANOVA a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: o autor (2018).

Na Tabela 4 estão os valores médios correspondentes a % de nitrogênio da parte aérea e dos grãos, bem como variáveis do rendimento da cultura.

Tabela 4. Efeito de diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação na soja sobre a porcentagem de nitrogênio da parte vegetativa e dos grãos aos 31 dias após a emergência e do rendimento da cultura.

Tratamentos	% de Nitrogênio		Rendimento		
	Parte aérea	Grãos	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )	Sacas ha <sup>-1</sup>	Massa de mil grãos (gr)
1) Testemunha	3,46 ns	4,44 ns	4369,37 a*	72,82	153,82 b*
2) Testemunha Nitrogenada	2,98	4,67	4594,78 a	76,58	163,75 a
3) <i>B. japonicum</i> (Sementes)	2,94	5,53	4305,23 a	71,75	147,32 b
4) <i>B. japonicum</i> (Sulco)	3,47	5,37	4151,32 b	69,19	152,18 b
5) <i>B. japonicum</i> (Pós emergência)	3,13	4,56	4742,48 a	79,04	153,82 b
6) <i>B. japonicum</i> + <i>B. subtilis</i> (Sementes)	3,34	4,03	4465,60 a	74,43	151,42 b
7) <i>B. japonicum</i> + <i>B. subtilis</i> (Sulco)	3,10	5,28	3779,32 b	62,99	151,75 b
8) <i>B. japonicum</i> + <i>B. subtilis</i> (Pós emergência)	3,20	5,07	4565,08 a	76,08	156,27 b
CV (%)	21,76	19,12	10,13	-	3,96

\* Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. <sup>ns</sup> Médias não significativas pela ANOVA a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: o autor (2018).

As variáveis número de nódulos e número de nódulos maiores que 2 mm sofreram efeito dos tratamentos, sendo que a menor nodulação foi obtida na testemunha com nitrogênio mineral (Tabela 3). Para o número de nódulos maiores que 2 mm, houve uma redução drástica de aproximadamente 99% da testemunha com nitrogênio mineral em comparação com a média total e com a testemunha absoluta. Desta forma a hipótese levantada foi rejeitada, sendo que nenhum dos tratamentos com a coinoculação das bactérias *B. japonicum* e *B. subtilis* foram superiores estatisticamente a inoculação isolada de *B. japonicum*.

Segundo Hungria et al., (2001), é fundamental obter um bom número de nódulos maiores ou iguais a 2 mm, pois estes possuem maior capacidade de fixação de nitrogênio. Além disso, uma planta de soja com boa nodulação deve apresentar de 15 a 30 nódulos. A média geral do presente trabalho foi de 12,9 nódulos por planta, sendo inferior ao ideal.

Os dados deste estudo corroboram os trabalhos descritos na literatura, que relatam diminuição da nodulação bem como no tamanho dos nódulos quando há aplicação de adubos nitrogenados na cultura da soja.

Como exemplo, os resultados de Hungria et al., (2013) revelaram nodulação baixa na testemunha nitrogenada nos quatro experimentos desenvolvidos em locais diferentes do Brasil. A redução do número de nódulos foi de 46% em Londrina, 54% em Ponta Grossa, 76% em Rio verde e 92% em Cachoeira Dourada, totalizando uma diminuição média de 67%.

Em experimento realizado no ano de 2004 no município de Rio Verde – GO, conduzido em dois locais quanto ao histórico de cultivo (área antiga de cultivo de soja e área nova), Vieira Neto et al., (2008) encontraram redução significativa no número de nódulos em área antiga de cultivo (62%) e área nova (72%) da testemunha nitrogenada (na dosagem de 200 kg ha<sup>-1</sup> de uréia), em comparação com a testemunha absoluta (semente pura, sem qualquer tratamento).

Zilli et al., (2008), comparando os tratamentos de inoculação padrão e inoculação pós emergência com a testemunha nitrogenada encontraram uma redução na nodulação da soja aos 35 dias após a emergência de 91% e 81% respectivamente. Já Zilli et al., (2010) não observaram diferença estatística no número de nódulos no ano de 2006 comparando a testemunha nitrogenada com o inoculado sem fungicidas.

Desta maneira, os resultados do presente experimento confirmam que o uso da adubação nitrogenada é prejudicial para a sobrevivência e tamanho dos nódulos. Na maioria das culturas os mecanismos fisiológicos são regulados pelo sistema de “*feed back*”, ou seja, os eventos são consequências da falta ou dos excessos. A falta de uma substância induz sua produção e o excesso inibe a produção (ALMEIDA, 2015).

O estresse provocado pela falta de nitrogênio induz a enzima PAL (fenilalanina amônia liase) a produzir as isoflavonas, que vão sinalizar ao *B. japonicum* para que infeccione a soja e passe a se reproduzir nos nódulos e fixar nitrogênio. Ao adubar com nitrogênio de forma mineral (uréia, nitrato) a soja vai absorver o N do solo na forma de amônio ou nitrato para se manter, ficando desfavorável, em termos energéticos, ficando difícil estabelecer a simbiose, uma vez que isso demanda uma carga considerável de energia por parte da própria planta (ALMEIDA, 2015).

No entanto, se a planta não estabelecer a simbiose nos primeiros estádios, quando atingir o estágio V4/ V5 vai demandar muito mais nitrogênio e o estresse vai liberar as isoflavonas (sinal químico de reconhecimento das plantas para com as bactérias). Até que haja

todas as interações bioquímicas, haverá falta de N, pois a planta estará chegando ao estágio reprodutivo (ALMEIDA, 2015).

Ao contrário do que foi observado no trabalho o efeito benéfico de *Bacillus* sp. sobre a nodulação de soja já foi observado por Li e Alexander (1988), que avaliaram o efeito da inoculação das sementes com *Bacillus* sp. sobre a nodulação e crescimento de soja após 76 dias. Ao efetuarem a coinoculação com *Bacillus* sp. e *B. japonicum*, verificaram diferença estatística e aumento de 57% na quantidade de nódulos comparado com o tratamento padrão (*B. japonicum* nas sementes) e 356% se comparado com a testemunha absoluta.

Araujo e Hungria (1999) avaliaram a viabilidade da coinoculação com *B. japonicum* + *B. subtilis* em Londrina. Os autores registraram uma média de 14,6 nódulos por planta, sem diferença significativa na nodulação em V3 na safra 93/ 94 comparado a inoculação padrão, com média de 14,8 nódulos por planta. O mesmo aconteceu em Ponta Grossa, mesmo sem diferença estatística o tratamento coinoculado apresentou média de 15,7 nódulos por planta enquanto que o tratamento de inoculação padrão apresentou média de 17,2 nódulos por planta.

De uma forma geral, os valores encontrados foram baixos, e isso pode estar relacionado ao pH do solo. Silva et al., (2002) relatam que para obter boa eficiência de bactérias fixadoras no solo, o mesmo deve apresentar pH em torno de 6,5. De acordo com a análise de solo (Tabela 1) o pH da área experimental foi de 5,7, valor abaixo do ideal. Outro fator que pode ter influenciado de forma negativa na nodulação é o déficit hídrico ocorrido entre a segunda quinzena de novembro e a primeira de dezembro, com média de aproximadamente 15 mm em 30 dias (Figura 1). É provável que isso dificultou a percolação e mobilidade das bactérias no perfil do solo e, assim, a colonização das raízes. Se uma planta sofre um estresse por déficit hídrico, altera todo o seu metabolismo e consequentemente o metabolismo simbiótico com as bactérias. O nódulo desidrata e a atividade da nitrogenase (enzima responsável pela transformação do nitrogênio atmosférico em amônia) diminui ou até mesmo cessa. Caso seja um período de seca curto, o nódulo se reidrata e a nitrogenase é reativada, retomando a FBN (FERNANDES JÚNIOR, REIS, 2008).

O déficit hídrico também pode desencadear respostas fisiológicas e anatômicas nas plantas, como diminuição da emissão de pelos radiculares, diminuição da síntese de leghemoglobina e abortamento de nódulos (GOORMACHTIG et al., 2014; FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008).

Sabe-se que o contato da bactéria com as sementes tratadas com fungicida e ou inseticida causa mortalidade das mesmas. Campo et al., (2001) já relataram que esse tipo de

tratamento reduz a nodulação e afeta a eficiência da FBN, podendo comprometer os rendimentos da cultura.

Desta forma, comparando o efeito de *B. subtilis* com *B. japonicum* não foi verificado aumento na quantidade de nódulos no presente trabalho, embora também não tenha prejudicado a associação.

#### 4.1. NÚMERO DE NÓDULOS VIÁVEIS

A variável número de nódulos viáveis sofreu efeito dos tratamentos testados, sendo que o tratamento com nitrogênio mineral apresentou valores inferiores aos demais (Tabela 3). Neste tratamento, foram observados em média 0,08 nódulos viáveis por planta, portanto, conclui-se ocorreu uma redução de 99% na viabilidade em comparação a todos os tratamentos, incluindo testemunha e inoculação padrão.

Vieira Neto et al., (2008), relatam que em área já cultivada há diminuição de 66% no número de nódulos viáveis da testemunha nitrogenada comparada com a testemunha absoluta e 68% em comparação com o tratamento de inoculação padrão.

Magro (2018) ao avaliar a resposta da cultura da soja nos parâmetros de nodulação, crescimento e produtividade, em relação à inoculação pós-emergência, totalizou com uma média de 8,27 nódulos viáveis por planta e não encontrou diferença estatística comparando com a testemunha.

Araujo e Hungria (1999) não encontraram diferença estatística em ambas as áreas avaliadas, comparando o tratamento de coinoculação de *B. subtilis* + *B. japonicum* com o não inoculado. Vieira Neto et al., (2017) comprovam que a utilização de fungicidas na semente prejudica a viabilidade, entretanto, a utilização de inoculante na semente nua e no sulco não diferiram nos valores reportados em seu trabalho.

Comparando-se a média geral do número total de nódulos (13) e a média geral da viabilidade dos mesmos (8), percebe-se que houve uma redução de 39%. Essa redução pode ser explicada pela promiscuidade das leguminosas em nodular com várias estirpes rizobianas competitivas, porém ineficientes (PERRET et al., 2000) uma vez que no presente trabalho observou-se população elevadíssima de rizóbios ( $6,4 \times 10^6$  UFC gr<sup>-1</sup> de solo).

O déficit hídrico na segunda quinzena de novembro e na primeira de dezembro pode ter causado a desidratação dos nódulos, ocorrendo assim abortamento.

Além disso, o estabelecimento de duas culturas de inverno (aveia e azevém) que, de acordo com Sánchez et al., (2004) e Kohli et al., (2006), produzem ácidos fenólicos e

hidroxâmicos que são substâncias com efeito herbicida, podem ter causado a mortalidade de alguns nódulos.

Desta forma, não foram visualizados efeitos das diferentes formas de aplicação da inoculação com *B. japonicum* ou da coinoculação da mesma com *B. subtilis* embora também não tenha prejudicado. Rejeitando a hipótese na qual seriam superiores os tratamentos que receberam a coinoculação em qualquer forma de aplicação.

#### 4.2. MASSA DA MATÉRIA SECA DOS NÓDULOS

Neste trabalho, a massa da matéria seca dos nódulos foi afetada pela adubação nitrogenada, com uma média geral de 29,5 mg planta<sup>-1</sup>. A testemunha nitrogenada apresentou uma redução de aproximadamente 97% em comparação com a testemunha absoluta e a média geral.

Segundo Hungria et al., (2001) as plantas que não apresentarem número de nódulos entre 15 e 30, deverão, no florescimento, apresentar de 100 a 200 mg de nódulos por planta para atingirem altas produtividades e suprirem a demanda total de nitrogênio, verificando assim que são poucos nódulos mas são nódulos grandes e com alto potencial de FBN.

No trabalho de Magro (2018) avaliando a inoculação pós-emergência não ocorreu efeito dos tratamentos sobre esta variável.

Zilli et al., (2010) no ano de 2007 avaliando diferentes formas de inoculação relatam diminuição de mais de 90% na massa da matéria seca dos nódulos quando comparado o tratamento de inoculação no sulco com o de adubação nitrogenada.

Araujo e Hungria (1999) já detectavam que a nodulação no estágio V3 ou aproximadamente 30 dias após a emergência não excedia 50 mg planta<sup>-1</sup>, assim, encontraram igualdade estatística nos experimentos desenvolvidos em Ponta Grossa e Londrina nos tratamentos: não inoculado (testemunha), inoculação padrão (*B. japonicum*) e coinoculação (*B. japonicum* tolerante ao *Bacillus* + *B. subtilis*).

Munhoz (2016), avaliando o uso de diferentes técnicas de inoculação de sementes sobre o crescimento, nodulação e produtividade na cultura da soja, encontrou uma drástica redução na massa da matéria seca dos nódulos na ordem de 96% no tratamento de adubação nitrogenada em comparação com o de inoculação em pós emergência.

Subentende-se, no presente trabalho, que mesmo não havendo quantidade de nódulos, os mesmos não compensaram em tamanho, ficando inferiores e com pouco potencial. Um dos fatores que pode estar relacionado a isso é a população elevada de bactérias

naturalizadas (introduzidas e estabelecidas) e nativas, pois a área apresenta mais de 10 anos de produção sojícola e uma população elevadíssima de  $6,4 \times 10^6$  UFC gr<sup>-1</sup> de solo. Sabe-se que as leguminosas são promíscuas e nodulam com uma gama muito grande de estirpes rizobianas, muitas vezes ineficientes (PERRET, et al., 2000), essas estirpes nativas tem elevada capacidade competitiva e maior adaptação às condições edáficas do que as introduzidas. Portanto, é provável que existiu uma combinação entre a elevada promiscuidade das plantas, a baixa especificidade com estirpes bacterianas e a alta capacidade simbiótica e de nodulação (FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008).

Assim, a introdução de estirpes de rizóbio superiores na fixação de nitrogênio, geralmente não é bem-sucedida, devido a sua inabilidade em ocupar os nódulos em solos com população elevada de estirpes nativas e ou naturalizadas (TRIPLETT, 1990).

Outro fator prejudicial pode ter sido o déficit hídrico que antecedeu a coleta, fazendo com que o resultado fosse mascarado, deixando os nódulos mais flácidos, uma vez que as plantas respondem defensivamente evitando ao máximo a transpiração.

Desta forma, não foram visualizados efeitos das diferentes formas de aplicação da inoculação com *B. japonicum* ou da coinoculação da mesma com *B. subtilis* embora também não tenha prejudicado na massa da matéria seca dos nódulos. Rejeitando a hipótese na qual seriam superiores os tratamentos que receberam a coinoculação em qualquer forma de aplicação.

#### 4.3. MASSA DA MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA

Com uma média geral de 1,24 g planta<sup>-1</sup>, as diferentes formas de inoculação e coinoculação com *B. japonicum* e *B. subtilis* não influenciaram significativamente o resultado da massa da matéria seca da parte aérea.

Dorighele (2017), avaliando o efeito dos isolados de *Bacillus* spp. coinoculado com *B. japonicum*, encontrou uma média de 6,74 g planta<sup>-1</sup> aos 28 DAS, 5,5 g superior ao encontrado neste trabalho, entretanto, também não encontrou diferença estatística. No estudo de Bárbaro et al., (2009), a massa da matéria seca da parte aérea não diferiu estatisticamente nos tratamentos com adubação nitrogenada, inoculação, coinoculação e o controle (sem inoculação e adubação nitrogenada). No trabalho de Vieira Neto et al., (2017) avaliando a massa da matéria seca da parte aérea em lavoura consolidada do Cerrado com a aplicação de inoculante via sulco e em semente, foi encontrada diferença estatística. Comparando-se os tratamentos de inoculação na semente com fungicida e micronutriente (11 gramas por planta)



com o tratamento de uma dose de inoculante no sulco e outra na semente (15 gramas por planta), essa diferença foi expressada. Desta forma, o tratamento que recebeu uma dose no sulco foi 26% superior ao que foi apenas na semente com fungicida.

No estudo de Magro (2018), a média de massa da matéria seca da parte aérea foi de 7,97g planta<sup>-1</sup> em R2, sendo que não foram detectadas diferenças estatísticas nesta variável. Entretanto, não foi estabelecido uma testemunha nitrogenada e foi padronizada a utilização de uma formulação com nitrogênio na adubação de base.

Já Li e Alexander (1988) encontraram uma média de 7,70g planta<sup>-1</sup> no tratamento de coinoculação com *B. japonicum* + *Bacillus* sp., sendo este superior estatisticamente aos outros tratamentos e 23% em relação a testemunha absoluta.

Acredita-se que a cultura sofreu interferência pela competição com o azevém anteriormente utilizado para pastagem e cobertura, sendo resistente ao glifosato utilizado para dessecação Figura 6.

Figura 6. Plantas de azevém resistentes ao glifosato presentes na área.



Fonte: o autor (2018).

Que de acordo com Sánchez et al., (2004) e Kohli et al., (2006) a aveia-preta, o centeio e o azevém produzem ácidos fenólicos e hidroxâmicos que são substâncias com efeito herbicida. Esses aleloquímicos podem ter sido os responsáveis pela diminuição no crescimento das plantas e, consequentemente, na massa da matéria seca da parte aérea. De

fato, visualmente foi possível observar no campo o porte reduzido das plantas na referida época do desenvolvimento vegetativo.

No trabalho de Bárbaro et al. (2009), as plantas foram coletadas com aproximadamente 30 dias após a emergência, em V6, aproximadamente o mesmo período em que as plantas deste trabalho foram coletadas. Registrou-se uma média geral de 2,72 g planta<sup>-1</sup>, enquanto que neste trabalho foi de 1,24 g planta<sup>-1</sup>, uma redução de 54%, provavelmente ocasionada pela matocompetição.

Outro fator pode ter sido o déficit hídrico que antecedeu a coleta, fazendo com que o resultado fosse mascarado, uma vez que as plantas respondem defensivamente a este estresse evitando ao máximo a transpiração e diminuindo o crescimento.

Desta forma, não foram visualizados efeitos das diferentes formas de aplicação da inoculação com *B. japonicum* ou da coinoculação da mesma com *B. subtilis* embora também não tenha prejudicado o desenvolvimento vegetativo. Rejeitando a hipótese na qual seriam superiores os tratamentos que receberam a coinoculação em qualquer forma de aplicação.

#### 4.4. TEOR DE NITROGÊNIO DA PARTE AÉREA E NOS GRÃOS

Com uma média geral de 3,20% e 4,87% as diferentes formas de inoculação e coinoculação com *B. japonicum* e *B. subtilis* não influenciaram significativamente o resultado da porcentagem de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, respectivamente.

Vieira Neto et al., (2008) também avaliando as mesmas formas de inoculação não encontraram diferença estatística, não acarretando maior ou menor absorção de nutrientes, haja visto que os valores foram similares para todos os tratamentos com N, P, K e S.

Porém, Braccini et al., (2016), avaliando a inoculação na semente e no sulco, encontraram diferença estatística para a porcentagem de nitrogênio da parte aérea, a inoculação na semente apresentou superioridade estatística com teor de 4,92%, a inoculação no sulco 4,33% e a testemunha 3,55%, em 14 e 39% respectivamente.

Por se tratar de uma área com histórico de vários anos de cultivo utilizando adubações frequentes, foram encontrados altos teores desses elementos, que influenciam diretamente nesse resultado (VIEIRA NETO et al., 2008).

## 4.5. RENDIMENTO

### 4.5.1. Produtividade

Apresentando média geral de 4371,64 kg ha<sup>-1</sup> ou 72,86 sacas ha<sup>-1</sup> as diferentes formas de inoculação e coinoculação com *B. japonicum* e *B. subtilis* influenciaram significativamente no resultado de produtividade.

Com uma média de 66,09 sacas ha<sup>-1</sup>, a aplicação no sulco foi inferior estatisticamente as demais, independentemente da utilização da inoculação ou coinoculação. Comparando com as médias das aplicações nas sementes e em pós emergência com a aplicação no sulco, houve uma redução de 7 e 11,47 sacas ha<sup>-1</sup> respectivamente. Já em relação a testemunha a redução foi de 6,73 sacas ha<sup>-1</sup>.

A maior produtividade foi encontrada no tratamento 5, com a inoculação de *B. japonicum* em pós emergência, estatisticamente igual a testemunha, mas com uma diferença de 6,22 sacas ha<sup>-1</sup>. Este resultado não corrobora o obtido por Zilli et al., (2008) que obteve queda da produção em 12,2 sacas ha<sup>-1</sup> na inoculação pós emergência em comparação com a inoculação padrão e 18 sacas ha<sup>-1</sup> da testemunha. Os autores alegam que essa é uma boa prática em situações emergenciais, como no caso de ocorrerem falhas na inoculação, entretanto deve-se avaliar a viabilidade da operação considerando-se principalmente variáveis ambientais.

Assim, o resultado obtido corrobora com o de Munhoz (2016) que avaliou a inoculação pós-emergência, obteve aumento significativo de produtividade em 60% (30 sacas ha<sup>-1</sup>) em comparação a inoculação padrão.

Segundo Souza (2016), as plantas de soja respondem a inoculação pós emergência, porém existe a necessidade de alta umidade, chuva ou irrigação que favoreça o contato da bactéria com o sistema radicular. Em seu trabalho realizado no Mato grosso do Sul, avaliando a inoculação pós emergência nos estádios V1, V3, V6, R1 e R3 em área irrigada, independentemente do estágio de desenvolvimento, ocorreu aumento em 21% de produtividade em comparação com a inoculação via semente. Entretanto, na área de sequeiro não ocorreu diferença entre as inoculações suplementares com a inoculação via semente.

Ressalta-se que a população microbiana estabelecida no solo do presente experimento pode ter influenciado nesse resultado positivo da inoculação pós-emergência, da testemunha e também da inoculação padrão. Antes mesmo das bactérias inoculadas atingirem a rizosfera das plantas, os bradirizóbios estabelecidos já estavam formando os primeiros

nódulos, o que foi verificado visualmente a campo. Essa nodulação inicial pode ter disponibilizado uma quantidade maior de N para as plantas, favorecendo a produtividade final, mascarando o verdadeiro potencial da inoculação pós-emergência.

Segundo Dart (1977) quando a inoculação é feita apenas na semente de soja, a nodulação inicial ocorre nos primeiros pelos radiculares e degenera-se antes da completa formação de grãos, sendo o período crítico de demanda de nitrogênio pela planta de soja (VARGAS et al., 1982). Os nódulos formados posteriormente nas raízes, em solo com população estabelecida de rizóbio ou com pulverização suplementar, prolongam o período de FBN na soja (CIAFARDINI, BARBIERI, 1987).

A menor produtividade foi encontrada no tratamento 7, com a coinoculação de *B. japonicum* + *B. subtilis* no sulco de semeadura. Estatisticamente inferior a testemunha, com uma diferença de 9,83 sacas ha<sup>-1</sup>. Estes resultados não corroboram os descritos por Vieira Neto et al., (2008) e Campo et al., (2010) que não encontraram diferença estatística na produtividade ao avaliar a aplicação de inoculante na cultura da soja, via semente ou sulco de semeadura. Zilli et al., (2010), ao contrário deste trabalho, encontrou um aumento de produtividade de 4,7 sacas ha<sup>-1</sup> na inoculação via sulco de semeadura sobre a inoculação nas sementes e 20,6 sacas ha<sup>-1</sup> da testemunha absoluta no ano agrícola de 2007. Porém, os dados desse experimento estão em concordância com os resultados de Braccini et al., (2016) que encontraram diferença estatística nas diferentes formas de aplicação de *B. japonicum*. O tratamento de inoculação nas sementes foi superior estatisticamente ao tratamento de inoculação no sulco e a testemunha absoluta em 9,5 e 23 sacas ha<sup>-1</sup> respectivamente.

A aplicação de inoculante líquido no sulco aumenta a área de contato das raízes com o inoculante, facilitando o contato das raízes com o *Bradyrhizobium*. Além disso, a inoculação no sulco de semeadura é uma alternativa viável e recomendada para a soja quando as sementes são tratadas com fungicidas e inseticidas porque diminui a mortalidade microbiana causada por fungicidas e inseticidas (ZILLI, 2010).

Neste trabalho, a coinoculação no sulco (T7) promoveu valores inferiores estatisticamente à coinoculação nas sementes (T6) e a testemunha (T1) em 11,44 e 9,8 sacas ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

Araújo e Hungria (1999) avaliaram a coinoculação de *B. japonicum* com *B. subtilis* e não obtiveram diferença estatística em comparação com a inoculação apenas com *B. japonicum* nos resultados de produtividade no experimento conduzido em Londrina, na safra 94/ 95. Marinković et al., (2016) avaliaram na Sérvia, os mesmos tratamentos, e a coinoculação com *B. subtilis* resultou em uma queda de produtividade de 2,4 sacas ha<sup>-1</sup> em

comparação a inoculação tradicional com *B. japonicum*. Entretanto, Schäfer (2017) inoculou *B. subtilis* na semente e obteve incremento de produtividade de 6 sacas  $\text{ha}^{-1}$  em relação à testemunha.

O resultado negativo em relação a coinoculação no sulco pode ter relação com o contato direto da bactéria no solo, a competição com bactérias nativas e a grande taxa de mortalidade das que ficaram em contato com as sementes tratadas. A melhor resposta das plantas ao inoculante se dá quando as bactérias estão espacialmente próximas ao sistema radicular das plântulas, nas primeiras semanas de desenvolvimento, o que ocorre normalmente quando se faz inoculação nas sementes, pois o inoculante estará o mais próximo possível. Nesse estágio, os rizóbios captam os sinais da planta e infectam as raízes, formando dos nódulos (SPAINK, 1995; HIRSCH et al., 2003; MOREIRA, SIQUEIRA, 2006).

Desta forma, foram visualizados efeitos das diferentes formas de aplicação da inoculação com *B. japonicum* ou da coinoculação da mesma com *B. subtilis*, de maneira geral a aplicação no sulco de semeadura foi inferior as demais, afetando a produtividade. Rejeitando a hipótese na qual seriam superiores os tratamentos que receberam a coinoculação em qualquer forma de aplicação.

#### 4.5.2. Massa de mil grãos

As diferentes formas de inoculação e coinoculação com *B. japonicum* e *B. subtilis* não influenciaram significativamente no resultado da massa de mil grãos. Com uma média de 163,75g, a testemunha nitrogenada (T2) foi superior estatisticamente aos demais, independentemente da utilização da inoculação ou coinoculação, mas não influenciou diretamente no rendimento. Esses resultados não corroboram com os reportados por Braccini et al., (2016), que encontraram igualdade estatística na massa de mil grãos entre as testemunhas nitrogenada (90,2g) e absoluta (87,82g). Porém, o resultado da inoculação na semente apenas com *B. japonicum* (116,54g) foi superior a testemunha nitrogenada em 22,6% e influenciou diretamente no rendimento em 55% ( $1180 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Pereira, et al., (2016) não encontraram diferença estatística nesta variável avaliando os efeitos de diferentes doses, formas (líquido e turfoso) e vias (sementes e sulco) de aplicação de inoculante a base de *B. japonicum*, entretanto na produtividade a inoculação no sulco ( $1947 \text{ kg ha}^{-1}$ ) foi 99% superior a testemunha com ( $999 \text{ kg ha}^{-1}$ ). García (2015) avaliou o efeito da aplicação de *B. japonicum* e *A. brasilense* e não observou efeito significativo da aplicação destas bactérias tanto isolado como associadas, na massa de 1000 grãos de soja. Paniagua et al., (2017), estudando o efeito

de diferentes doses e épocas de aplicação de inoculante na cultura da soja, não notaram diferença estatística nesta variável e nem na produtividade.

Assim, com diferença estatística entre os tratamentos, a análise de produtividade deste experimento fica comprometida em seu entendimento. Como existem vários fatores que influenciam a produtividade, não é possível afirmar qual componente de produção foi responsável pela diminuição registrada, com exceção da massa de 1000 grãos, que apresentou diferença nesta avaliação.

## 5. CONCLUSÕES

Conforme as condições de experimentação e da cultivar utilizada, a coinoculação de *B. japonicum* com *B. subtilis* não foi eficaz em nenhuma variável e método de aplicação, mas também não mostrou prejuízos.

O método de aplicação no sulco de semeadura, influenciou negativamente a produtividade da cultura.

A coinoculação de *B. japonicum* em qualquer forma de aplicação juntamente com *B. subtilis* não influenciou significativamente a nodulação, desenvolvimento vegetativo, teor de nitrogênio nos grãos e na parte aérea.

Podem ter ocorrido resultados positivos em variáveis não analisadas nesse trabalho, sendo necessários mais estudos para comprovar a eficácia dos métodos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. C. V. A polêmica do uso de nitrogênio em soja. **Revista online Doutores da Terra**. Ed. 03 - Out/Nov. 2015. Disponível em: <<http://www.doutoresdaterra.com.br/plantas/a-polemica-do-uso-de-nitrogenio-em-soja>>.
- ANAIS DA 13ª REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA (RELARE). Londrina: **EMBRAPA SOJA**, 2007. 212 p. – (Documento/Embrapa Soja, n.290).
- ANPII (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES). Levantamento do uso de inoculantes no Brasil. **Apresentação no Congresso Brasileiro de Soja**, 2018.
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.9, p.1633, set. 1999.
- BÁRBARO, I. M. et al. Produtividade da soja em resposta a inoculação padrão e coinoculação. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n.1, Jan-Jun. 2009, p. 01-07.
- BÁRBARO-TORNELI, L. M.; FINOTO, E. L.; TOKUDA, F. S.; MEDEIROS, C. N. F.; GASPARINI, A. C.; BORGES, W. L. B.; et al.; Influência de modos de aplicação da coinoculação no desempenho agrônomo de soja. **Nucleus**. Edição Especial, 2018.
- BOONKERD, N.; ARUNSRI, C.; RUNGRATTANAKASIN, W.; VASUVAT, Y. Effects of post-emergence inoculation on field grown soybeans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.1, p.155-161, 1985.
- BRACCINI, A.L. et al. Coinoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Parana**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016.
- CÂMARA, G. M. S. **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2000. 450 p.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. Inoculação no sulco de plantio da soja como alternativa para o tratamento de semente com fungicidas e micronutrientes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, n.4, p.1103–1112, 2010.
- CAMPOS, B. C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N<sub>2</sub> por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Cruz Alta – RS, v.25, n.32, p.583-592. 2001.
- CIASFARDINI, G.; BARBIERI, C. Effects of cover inoculation of soybean on nodulation, nitrogen fixation, and yield. **Agronomy Journal**, 79:645-648, 1987.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – ISSN 2318-6852 **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 5 Safra 2017/18 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-132, jan/2018.



CORREIA, T. P. S. **Eficiência operacional, econômica e agrônoma da inoculação de soja via sulco de semeadura**. Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – Campus de Botucatu, 2015. 106p. Tese de Doutorado.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.

DART, J. Infection and development of leguminous nodules. Em: HARDY, R. W. F.; SILVER, W. S. A treatise on dinitrogen fixation. Section III-BIOLOGY. New York, **John Wiley & Sons**, 1977. p.307-472.

DATTA, M.; BANIK, S.; GUPTA, K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant and Soil**, v.69, p.365-373, 1982.

DORIGHELO, D. V. **Versatilidade de *Bacillus spp.* no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja**. Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp – Campus de Botucatu.2017. 135p. (Tese de doutorado).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil**. Londrina, Embrapa Soja/Embrapa Cerrados/Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 280p. (Sistema de Produção, 12).

EMBRAPA SOJA. **Soja na Alimentação**. Londrina, 2007. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/soja\\_alimentacao/index.php](http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php)>.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. **Artículos Técnicos – Agricultura**. 2006.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. Ciências Agrotecnológicas, n. 35, p. 1039-1042, 2001.

FERNANDES JÚNIOR, P.I.; REIS, V. M. Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 2008. 33p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252).

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 23, n. 1, p. 36-41, jan./mar. 1997.

GARCIA, A. **Doses de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas, na produção e na qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo.

GLICK, B.R. et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.911-915, 1994.

GOORMACHTIG, S; CAPOEN, W.; JAMES, E. K.; HOLSTERS, M. Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 6303-6308, 2004.

- HIRSCH, A. M.; BAUER, W. D.; BIRD, D. M.; CULLIMORE, J.; TYLER, B.; YODER, J. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. **Ecology**, v.84, p.858-868, 2003.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed coinoculation with *Bradyrhizobium spp.* and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American journal of plant sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015.
- HUNGRIA, M.; CAMPO R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina, Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.35).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Tecnologia de coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: **Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil**, 33., 2013, Londrina. Resumos expandidos. Brasília, DF: Embrapa, 2013., 2013.
- JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A. C.; JULIATTI, F.C. **Manejo integrado de doenças na cultura da soja**. 1ª. Ed. Uberlândia-MG. 2004. 327p.
- KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Allelopathic interactions in agroecosystems with ecological implications. **Dordrecht: Springer**, p. 465-492, 2006.
- KÖPPEN, W. **Grundriss der Klimakunde**. Berlin: Walter de Gruyter, 1931. 390p.
- LANNA FILHO, R. et al. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**. v.4, n. 2, 2010.
- LI, D. M.; Alexander A. 1988. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil** 108: 211–219.
- LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. In: LUZ, W. C. et al. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1996. p.1-49.
- MARINKOVIĆ, J. et al., Effects of soybean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in field trial. **Romanian Biotechnological Letters**. 2016.
- MAGRO, M. R.; MACIEL, J. F. S. **Teste de tecnologias de inoculação da soja em colaboração com a empresa Total Biotecnologia: Relatório**. Curitibanos: UFSC, 2016. 32 f. Não publicado.
- MAGRO, M. R. **Resposta da cultura da soja a inoculação com bactérias promotoras de crescimento e pulverização de bioestimulante**. 2018. 34 p. (Trabalho de conclusão de curso) – Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, Santa Catarina. 2018.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. 488 p.

- MERRIMAN, P. R.; PRICE, R. D.; KOLLMORGEN, J. F.; PIGOTT, T.; RIDGE, E. H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Journal of Agriculture Research**, series Am v. 25, p. 219-226, 1974.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. atual. ampliado. Lavras: Ed. da UFLA, 2006. 729p.
- MUNHOZ, A. T. **Técnicas de inoculação com bactérias de fixação de nitrogênio na cultura da soja**. 2016. 50 p. (Trabalho de conclusão de curso) – Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, Santa Catarina. 2016.
- PANIAGUA, B. A.; MAZZETTO, E.; ALVAREZ, J. W. R.; FIGUEIREDO, J. C. K. Doses e forma de aplicação de inoculante e seu efeito na cultura da soja. **Revista Varia Scientia Agrárias** v. 05, n.02, p. 19-31, 2017.
- PEREIRA, C. S.; MONTEIRO, E.; BOTIN, A.; MANHAGUANHA, T. J.; BRAULINO, D. Diferentes Vias, Formas e Doses de Aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* na Cultura da Soja. **Global Science and Technology**. Rio Verde, v.09, n.01, p.56 – 67, jan/abr. 2016.
- PERRET, X., STAHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 64: 180 – 201, 2000.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-11, 2001.
- RONSANI, A. L.; PINHEIRO, M. G.; PURIN, P. **Efeitos de diferentes formulações e técnicas de inoculação no crescimento da soja**. XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Ago. 2013. Florianópolis – SC.
- SANTOS, H. G. et al. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS)**. 4. ed. – Brasília, DF: Embrapa, 2014. 376p.
- SÁNCHEZ, A. M.; WEISS, O. A.; REIGOSA, M. J. Allelopathic Evidence in the Poaceae. **The Botanical Review**, v. 69, p. 300-319, 2004.
- SOUZA, L. G. M. **Otimização da fixação biológica de nitrogênio na soja em função da reinoculação em cobertura sob plantio direto**. 2016. 72 p. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de engenharia de Ilha Solteira, São Paulo. 2016.
- SCHÄFER, E. L. **Avaliação de microrganismos promotores de crescimento e proteção na cultura da soja (*Glycine max*)**. 2017. 40 p. (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Regional do Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, Rio Grande do Sul. 2017.
- SPAINK, H.P. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.345-368, 1995.
- SILVA, A. F.; FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 1327-1333, 2002.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. VOLKWEISS, S. J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre, **Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2010.

TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.3, p.199-206, 1990.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v.42, n. 2, 2006.

TURNER, J. T.; BACKMAN, P. A. Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**. v.75. p.347-353. 1991.

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R. SUHET, A. R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 17:1127-1132, 1982.

VIEIRA NETO, S. A.; PIRES, F. R.; MENEZES, C. C. E.; MENEZES, J. F. S.; SILVA, A. G.; SILVA, G. P.; ASSIS, R. L. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 861-870, 2008.

VIEIRA NETO, S. A.; PIRES, F. R.; MADALÃO, J. C.; VIANA, D. G.; MENEZES, C. C. E.; ASSIS, R. L. Crescimento e desempenho produtivo de plantas de soja em função da aplicação de inoculante via sulco e em semente. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, suplemento 1, p. 2387-2398, 2017.

VOSS, M. Inoculação de rizóbio no sulco de semeadura para soja, em um campo nativo, no norte do Rio Grande do Sul. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 2002. 5p.html (**Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online**, 108). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p-co108.html>.

ZILLI, J. E.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; ROUWS, R. C.; HUNGRIA, M. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa. v. 34, n. 6, p.1875-1881. 2010.

ZILLI, J. E.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.4, p.541-544, abr. 2008.